高通量测序分析人工养殖成年林麝粪便古菌菌群多样性

王立志[1]　徐谊英[1]　蔡永华[2]

（1.四川农业大学动物营养研究所，动物抗病营养教育部重点实验室，雅安 625014；2.四川养麝研究所，都江堰 611845）

摘　要：本试验的目的是采用高通量测序技术研究人工养殖成年林麝粪便中古菌的结构和组成，并对比不同性别之间的差异。选取 12 只 3 岁健康的林麝依据性别分为雄性组（M 组）和雌性组（F 组），每组各 6 只。采集其新鲜粪便，提取 DNA，用古菌通用引物 PCR 扩增古菌 16S rRNA 的 V4~V5 区，用 MiSeq 300PE 测序平台对扩增产物进行高通量测序，用 QIIME 等软件对测序序列进行分析统计。结果表明：在从门到属的各级分类水平上，F 组与 M 组古菌的相对丰度差异均不显著（P>0.05）。M 组和 F 组的组内遗传距离分别为（0.16±0.03）和（0.27±0.06），组间为（0.24±0.07），样品的相似度很高。林麝粪便中的古菌可以分为 3 个门，优势门为阔古细菌门（Euryarchaeota）；在属水平上可以分为 7 个已知属，优势属为甲烷短杆菌属（*Methanobrevibacter*），其次为热裸单胞菌属（*Thermogymnomonas*）。结果提示，雄性和雌性林麝粪便中古菌的结构和组成都没有显著差异，*Methanobrevibacter* 是林麝粪便中的优势古菌属

关键词：林麝；古菌；产甲烷菌；多样性

中图分类号：S852.6

林麝（*Moschus berezovskii*）属偶蹄目，麝科，麝属，是一种珍贵的野生药用、香料资源动物，曾经广泛分布于我国的中部和南部[1]。近年来由于栖息地遭受破坏和过度捕猎，数量已急剧下降。目前已被国际自然和自然资源保护联盟（IUCN）列为濒危物种(http://www.iucnredlist.org/details/13894/0)。

我国从 20 世纪 60 年代开始人工驯化养殖林麝，至今已有近 60 年的历史，但发展速度很慢。其中一个主要的原因是人们对林麝的消化生理知识了解很少。林麝是草食性反刍动物，但其胃肠道微生物菌群的组成和结构还不为人所知。为了更好保护和人工驯化养殖，有必要对林麝胃肠道微生物菌群进行系统研究。众所周知,反刍动物瘤胃中栖息着大量微生物，包

收稿日期：2015-08-01

基金项目：科技部国际合作项目“畜禽低碳养殖关键调控技术合作研究”（2014DFA32860）

作者简介：王立志（1974—），男，湖北武汉人，副教授，博士，主要从事动物营养学研究。E-mail: wanglizhi@aliyun.com

括细菌、真菌、原虫和古菌等。近年来瘤胃产甲烷古菌越来越受到人们的关注，因为人们相信它们与全球越来越严重的温室效应有关[2]。产甲烷古菌广泛存在于草食动物的胃肠道中，迄今为止，人们已经从水牛[3-4]、绵羊[5]、袋鼠[6]、奶牛[7]、犀牛[8]、肉牛[9-10]、骆驼[11]、牦牛[12]等动物上分离鉴定出了多种产甲烷古菌。综合这些研究可以发现，动物胃肠道产甲烷古菌的多样性具有宿主特异性。因此作者推测，相对于其他动物而言，林麝肠道古菌的结构和组成可能有很大的差异。而有关林麝肠道产甲烷菌的研究还未见报道。本试验的目的就是用高通量测序技术对林麝粪便中古菌的结构和组成进行研究，并对比不同性别之间的差异。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样品采集

本次试验动物为 12 只人工养殖的林麝，根据其性别分为雄性林麝组（M 组）和雌性林麝组（F 组）两组。每组各 6 只（6 只雄性林麝编号为 M1、M2、M3、M4、M5、M6；6 只雌性林麝编号为 F1、F2、F3、F4、F5、F6），年龄均为 3 岁，平均体重为 7.58±1.596 kg 的未用过抗生素的健康林麝，饲养于四川省养麝研究所（中国四川都江堰）。林麝单笼饲养，每天饲喂两次，时间为上午 8 点和下午 5 点，自由饮水。饲粮组成见表 1，在采样之前已稳定饲喂该饲粮 28 天以上。于第 29 天清晨饲喂前戴上消毒过的无菌一次性手套用干净竹签采集动物自然排出的粪便并从粪便深处采集，每头林麝收集新鲜粪便 20 克，液氮保存后带回实验室，保存于-80℃冰箱，用于提取 DNA。

表 1　饲粮组成及营养水平（干物质基础）

Table1　Composition and nutrient levels of the diet （DM basis）　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	6.00
麦麸 Wheat bran	4.00
全脂大豆 Full-fat soybean	4.00
苜蓿草粉 Alfalfa meal	3.00
桑树叶 Mulberry leaf	35.00
野青草 Wild green grass	45.00
食盐 NaCl	0.40
碳酸钙 $CaCO_3$	1.50
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	0.80

复合维生素 Multi-vitamin[1)]	0.15
复合微量矿物元素 Multi-mineral[2)]	0.15
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrition levels[3)]	
干物质 DM	88.07
粗蛋白质 CP	15.53
粗脂肪 EE	3.16
酸性洗涤纤维 ADF	18.65
中性洗涤纤维 NDF	41.78
钙 Ca	1.17
磷 P	0.48

1)复合维生素为每千克饲粮提供 Multi-vitamin provided the following per kg of diet:

2)复合微量矿物元素为每千克饲粮提供 Multi-mineral provided the following per kg of diet:

3)实测值 Measured values。

1.2 DNA 抽提

用TIANamp微生物DNA Kit[天根生化科技(北京)有限公司]提取林麝粪便样品中微生物总DNA，具体提取步骤参照试剂盒说明书进行。用DNA纯化试剂盒对提取的DNA进行纯化，然后用原子分光光度计和琼脂凝胶电泳检验总DNA浓度和纯度后于-20 ℃保存备用。

1.3 16S rRNA基因扩增及测序

以林麝粪便微生物总DNA为模板，采用古菌通用引物对：341F(5′-CCTAYGGGRBGCASCAG-3′)和806R（5′-GGACTACHVGGGTWTCAAT-3′)[13]，PCR扩增古菌16Sr RNA的V4~V5区。采用50 μL扩增体系：上、下游引物各0.5 μL，2.5 mmol/L dNTP混合物5 μL，5 μL的10×Ex Taq buffer（含20 mmol/L Mg^{2+}，TaKaRa公司），0.25 μL的Ex Taq DNA polymerase（TaKaRa公司），1 μL的样品DNA模板和37.75 μL的milli-Q水。PCR反应条件为：94 ℃变性3 min；94 ℃ 30 s，50 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，进行30个循环；72 ℃，延伸5 min。每个样品进行3个重复，将同一样品的PCR产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测，用QIAquick凝胶回收试剂盒（QIAGEN公司）切胶回收古菌PCR产物，并用试剂盒（QIAGEN公司）进行纯化。纯化的PCR产物送Macrogen生物技术公司（韩国），用Illumina公司的MiSeq 300PE测序平台进行高通量测序。

1.4 数据分析

使用FLASH软件将测序所得的测序序列（reads）进行双端融合（merge），最小重叠区域为10 bp，最大重叠区域为220 bp。成功merge的序列，使用QIIME软件[14]按照条码（barcode）序列区分各个样品，去除低质量序列。标准如下：去除所有含有N的reads；去除含有连续3个小于Q20碱基的reads；去除与barcode序列不一致的reads；去除连续Q20碱基长度小于序列总长75%的reads。将barcode切除掉后，根据相似性≥97%原则将通过质控的有效序列聚类成为运算分类单位（Operational Taxonomic Unit，OTU），并挑选丰度最高的序列作为OTU的代表性序列；使用QIIME软件将OTU代表序列与RDP数据库（The Ribosomal Database Project，https://rdp.cme.msu.edu/）进行比对，参数为默认参数（相似度为0.9），比对完毕后使用perl脚本去除所有非古菌OTU。用QIIME软件剔除嵌合体和Singletons，并在界、门、纲、目、科及属水平上进行物种注释。采用QIIME默认参数计算各个样品alpha多样性指数[Shannon指数、ChaoⅠ指数、观察物种（observed species)指数]。根据各个样品OTU的种类及其丰度，计算样品间的遗传距离，用非加权UniFrac距离（unweighted UniFrac distance）表示，根据计算结果采用非加权配对算术平均法（unweighted pair group method with arithmetic mean，UPGMA）聚类方法对样品进行聚类分析。利用perl脚本挑选所有样本中共同存在的共享属，用R软件进行绘制热图。2个处理间数据的差异性采用SPSS 19.0统计软件进行t检验。

2 结　果

2.1　序列及 OTU 统计

将测序得到的双端序列首先根据序列之间的重叠关系，将成对的 reads 拼接成 1 条序列，经过质控之后，最终获得 13 130 条属于古菌的有效序列，平均每个样品（1 094±1 164）条。基于相似度大于 97%基础上，将获得的有效序列进行 OTU 聚类，共获得 720 个属于古菌的 OTU，其中 M 组 385 个[平均值为（80.3±24.5）个]，F 组 409 个[平均值为（78.8±27.7）个]，组间共享 OTU 为 74 个（图 1）。经计算，M 组和 F 组的序列覆盖度（coverage）分别为 80.78%和 81.91%。

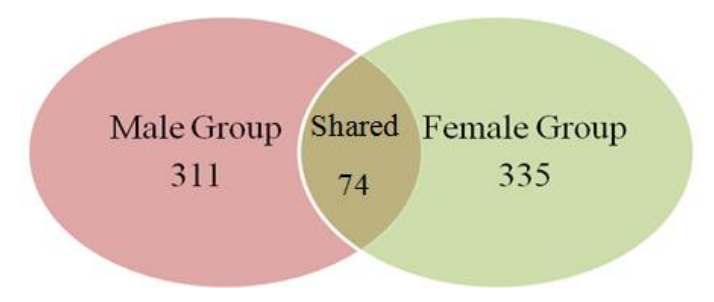


图 1　雄性林麝组和雌性林麝组粪样古菌 OUT 维恩图

Fig.1　Venn diagram showing the OTUs of fecal archaea in male and female forest musk deer groups

2.2 粪便物种组成分析

将获得的 OTU 分别从门到属水平上进行物种注释，具体结果见表 2。可以看出，本次试验所得到的 90%以上 OTU 都属于阔古细菌门(Euryarchaeota)，而圆齿古细菌门(Crenarchaeota)和未分类门的相对丰度较低。2 组间在各分类水平上的相对丰度差异均不显著（*P*＞0.05）。Crenarchaeota 的古菌全部来源于热变形菌纲(Thermoprotei)，它可进一步分为 2 个目。其中只有 Fervidicoccales 可进一步分为 1 个科和 1 个属。Euryarchaeota 由甲烷菌纲(Methanobacteria)、甲烷微菌纲（Methanomicrobia）、热原体纲（Thermoplasmata）和未分类纲 4 个纲组成。其中未分类纲不能进一步进行分类，其他 3 个纲共可分为 4 个目、6 个科、7 个属。Methanobacteria 由 1 个目、1 个科、3 个属组成；Methanomicrobia 由 2 个目、3 个科、3 个属组成；Thermoplasmata 由 1 个目，2 个科组成，在科水平上只有未确定的热源体科（Thermoplasmatales incertae sed）能进一步分到属。在属水平上，相对丰度所有平均值较高的是甲烷短杆菌属（*Methanobrevibacter*），其次为热源体属（*Thermogymnomonas*）。虽然在属水平上，2 组的差异均不显著（*P*>0.05），但与 M 组相比，F 组 *Fervidicoccus* 相对丰度有降低的趋势（*P*=0.10）。

表 2 林麝粪便在不同分类水平上的古菌组成及其相对丰度

Table 2 The archaeal composition and their relatively abundance at different classification levels in the feces of forest musk deer %

项目 Items	所有样品 All samples (*n*=12)	M 组 Group M (*n*=6)	F 组 Group F (*n*=6)	*P* 值（M 组 vs.F 组）*P*-value (group M vs. groups F)
未分类门 Unclassified phylum	0.38±1.93	0.99±0.93	0.45±0.67	0.28
圆齿古细菌门 Crenarchaeota	3.18±5.90	6.75±3.38	3.94±5.70	0.32
热变形菌纲 Thermoprotei	3.18±5.90	6.75±3.38	3.94±5.70	0.32
Fervidicoccales	0.17±1.62	0.49±0.53	0.06±0.14	0.10
Fervidicoccaceae	0.17±1.62	0.49±0.53	0.06±0.14	0.10
Fervidicoccus	0.17±1.62	0.49±0.53	0.06±0.14	0.10
未分类目 Unclassified order	3.00±7.20	6.26±3.04	3.89±5.43	0.37
阔古细菌门 Euryarchaeota	96.42±3.48	92.97±3.87	95.61±6.32	0.29
甲烷菌纲 Methanobacteria	78.21±48.24	77.20±10.59	66.39±24.25	0.35
甲烷杆菌目 Methanobacteriales	78.21±48.24	77.20±10.59	66.39±24.25	0.35
甲烷杆菌科 Methanobacteriaceae	78.21±48.24	77.20±10.59	66.39±24.25	0.35
甲烷短杆菌属 *Methanobrevibacter*	73.35±48.80	71.78±15.48	61.99±22.70	0.40
甲烷球形菌属 *Methanosphaera*	4.01±5.01	4.91±6.68	2.95±2.27	0.51
未分类属 Unclassified genus	0.84±1.62	0.50±0.97	1.45±1.48	0.21
甲烷微菌纲 Methanomicrobia	0.62±0.97	1.23±1.98	0.72±0.72	0.57
甲烷微生物目 Methanomicrobiales	0.44±0.92	0.97±1.58	0.48±0.51	0.49

甲烷粒菌科 Methanocorpusculacea	0.13±0.22	0.49±0.84	0.04±0.06	0.21
甲烷粒菌属 *Methanocorpusculum*	0.13±0.22	0.49±0.84	0.04±0.06	0.21
甲烷微生物科 Methanomicrobiaceae	0.31±0.42	0.47±0.75	0.44±0.49	0.93
甲烷微生物属 *Methanomicrobium*	0.31±0.42	0.47±0.75	0.44±0.49	0.93
甲烷八叠球菌目 Methanosarcinales	0.18±0.65	0.26±0.43	0.24±0.24	0.93
甲烷八叠球菌科 Methanosarcinaceae	0.18±0.65	0.26±0.43	0.24±0.24	0.93
甲烷微球菌属 *Methanimicrococcus*	0.18±0.65	0.26±0.43	0.24±0.24	0.93
热原体纲 Thermoplasmata	16.05±29.80	12.20±4.89	25.74±21.15	0.18
热原体目 Thermoplasmatales	16.05±29.80	12.20±4.89	25.74±21.15	0.18
未确定的热源体科 Thermoplasmatales incertae sedis	6.61±1.66	8.86±3.53	12.68±9.04	0.37
热源体属 *Thermogymnomonas*	6.61±1.66	8.86±3.53	12.68±9.04	0.37
未分类科 Unclassified family	8.66±0.35	4.33±0.86	13.06±20.45	0.33
未分类纲 Unclassified class	1.52±0.43	1.56±1.06	2.70±3.34	0.45

P<0.05：差异显著 significant difference；*P*<0.01：差异极显著 extremely significant difference。

2.3 alpha 多样性分析

表 3 列出了 M 组和 F 组样品的 Shannon 指数、ChaoⅠ指数、observed species 指数。alpha 多样性指数主要用于评价样品中微生物的丰富性和均匀性。可以看出，M 组的 alpha 多样性指数在数值上都大于 F 组，但差异不显著（*P*＞0.05）。

表 3 林麝粪便古菌的 alpha 多样性指数

Table3 The alpha indexes of fecal archaea of forest musk deer （*n*=6）

项目 Items	alpha 多样性指数 Alpha diversity index		
	ChaoⅠ	观察物种 Observed species	Shannon
M 组 Group M	47.06±35.93	20.17±5.62	3.46±0.92
F 组 Group F	42.55±16.72	17.94±5.08	2.94±0.82
P 值 *P*-value	0.678	0.476	0.328

2.4 beta 多样性分析

根据各个样品 OTU 的种类及其丰度计算了各个样品间的遗传距离，值越小表示样品间微生物群落结构越接近，相反，值越大则表示样品间微生物群落结构差异越大。M 组和 F 组各自的遗传距离分别为（0.16±0.03）和（0.27±0.06），2 组间遗传距离为（0.24±0.07），基于此，对样品进行了聚类分析并绘制了 PCoA 聚类图（图 2）。可以看出，除了样品 M4 和样品 M2 外，其他 10 个样品聚集度非常高。虽然 F 组较 M 组的聚集程度高，但 2 组样品在图上并没有依据其组别而表现出明显的组内聚集。

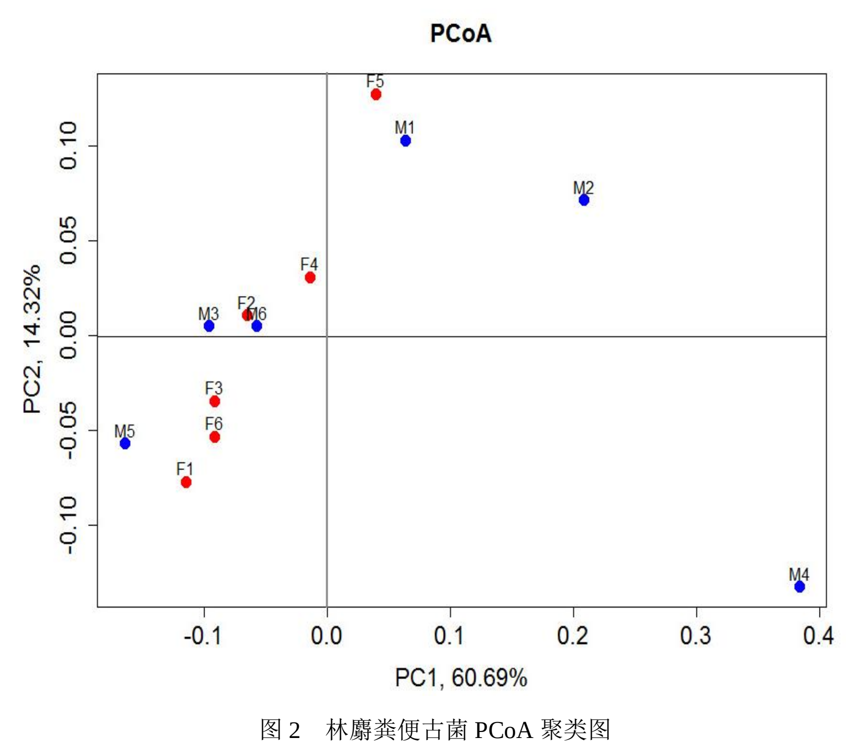
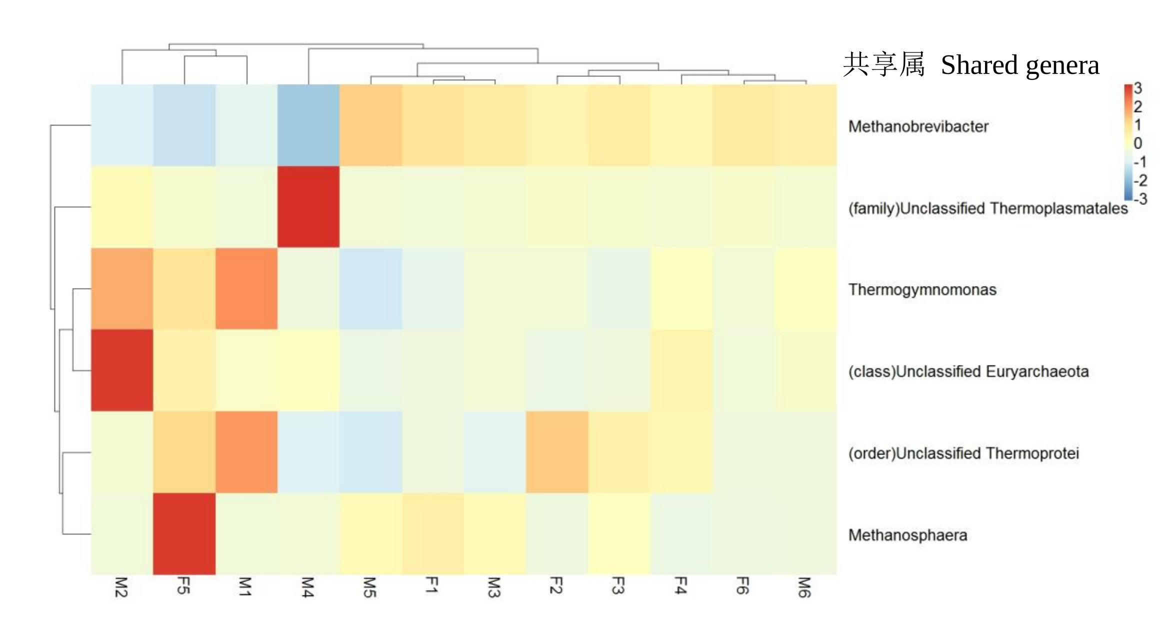


图 2　林麝粪便古菌 PCoA 聚类图

Fig.2　PCoA diagram reflecting clustering of fecal archaea of forest musk deer

2.5　共享属分析

由于 F 组和 M 组在古菌的物种组成和丰度，以及 alpha 多样性指数上没有显著差异，因此本试验将 12 个样品作为一个整体，分析了林麝粪便中古菌的共享属。本试验对 12 个样品间共享的古菌属进行了分析，并根据其丰度以热图的形式进行了展示（图 3）。可以看出，12 只林麝之间古菌共享属主要来源于 Euryarchaeota 的 Methanobacteria 和 Thermoplasmata 这 2 个纲。有些共享属在各个样品间的丰度很高，如 *Methanobrevibacter* 和 *Thermogymnomonas*，它们的平均相对丰度分别达到了样品古菌总相对丰度的 67%和 11%。而有些序列虽然也存在于所有样品中，但丰度极低，如 Euryarchaeota 的未分类纲。各个样品共享属的相对丰度占其古菌总相对丰度的比例平均在 96%以上，这说明在属水平上，性别对林麝粪便古菌优势菌群的种类几乎没有影响，但同时应该注意到共享属的丰度在各个样品间存在较大差异。



越偏向红色表示相对丰度越高，越偏向蓝色表示丰度越低。对于不能分类到属水平，但仍然出现在各样品中的共享序列，用其最高分类水平表示。

The more close to red, the higher the relative abundance, while the more close to blue, the lower the relative abundance. Shared sequences were expressed using the highest classification level, which could not be classified to any genus, but still existed in samples.

图 3　样品间共享属热图

Fig.3　Heatmap of shared archaea genera of all samples

3　讨　论

据了解，本文是第 1 篇有关林麝胃肠道古菌的研究报道。以往有关动物胃肠道古菌的研究，几乎全部采用的是克隆/测序技术[3-12]。这种技术不仅费时费力，而且仅能鉴定出样品中的优势菌群，不能全面反映动物胃肠道菌群的结构与组成[15]。高通量测序技术，是近年来才采用的一种研究微生物生态学的全新技术，它能较全面地鉴定出样品中微生物的种类[16-17]。在本次研究中，本试验采用高通量测序技术在 12 头林麝的粪便中，共获得 13 130 条属于古菌的有效序列，检测到了 720 个属于古菌的 OTU，而以往在反刍动物瘤胃[3-5,7]、袋鼠前肠[6]、动物粪便[8,11]等样品中，一次试验获得的古菌序列数量都在 1 000 左右，检测到的 OTU 个数一般都在 100 个左右，远远小于本次试验结果。本次试验的 OTU 经行物种注释后，共分为了 3 个门，8 个已知属。以往在动物胃肠道中发现的古菌几乎全部都来源于 Euryarchaeota，有关 Crenarchaeotea 的报道非常罕见，且一次试验最多仅能检测到 4~5 属的古菌。造成这种差异的原因，应该主要归于试验方法的差异。Kim 等[18]综合分析了 NCBI 等各种公共数据中的古菌序列，并以稀释曲线为基础进行估测，认为瘤胃样品中属于古菌的 OTU 应该大于 1 400 个，至少需要 24 480 条测序序列才能全面覆盖样品中的古菌。本试验

的测序序列数和 out 数大概是其 1/2，这可能是样品属性不同造成的。因为在前期研究中发现，山羊粪便中古菌多样性显著低于瘤胃[19]。

以往的研究表明，*Methanobrevibacter* 是单胃动物后肠[20-22]和反刍动物瘤胃[5,7]的优势古菌。例如，Wright 等[5]在对澳大利亚绵羊瘤胃古菌的研究中就发现，分析所得的 65 条古菌序列中，有 62 条都属于 *Methanobrevibacter*。在本试验中，在属水平上，*Methanobrevibacter* 不仅在 12 个样品间是共享属，而且在雄性、雌性林麝粪便中的相对丰度分别达到了 71.78%和 61.99%，属于绝对优势核心属，这与以往的很多研究结果是一致的。但也有研究表明，动物胃肠道的优势古菌不是甲烷短杆菌，如 Sundset 等[23]研究发现，来自驯鹿瘤胃的古菌，53%都属于未鉴定的古菌。Huang 等[12]也发现，在生存环境相同且饲喂饲粮一致的条件下，牦牛瘤胃中 80.9%的古菌来源于 Thermoplasmatales，只有 14.9%属于 Methanobacteriales。这说明动物胃肠道的古菌在结构和组成上存在宿主特异性，特定动物的古菌结构只有通过实际测定才能确定，而不能根据以往其他动物的试验结果进行推测。

在本试验中，与雄性林麝相比，雌性林麝粪便古菌在从门到属的各级分类水平上，相对丰度都没有显著差异。各项 alpha 多样性指数，不同性别间也没有显著差异，样品间的遗传距离都较小。这些都说明性别对林麝粪便中古菌的结构和组成没有显著影响。以往研究发现，影响胃肠道古菌的主要因素为品种、饲粮等。例如，Huang 等[12]研究发现，与牦牛相比，黄牛瘤胃中 Methanobacteriales(21.5% vs. 12.4%)和 Methanomicrobiales(9.8% vs. 1.0%)这 2 个目的相对丰度较高。Zhou 等[24]研究发现不同饲料利用效率的肉牛，瘤胃的古菌结构不同，低饲料利用效率组瘤胃古菌多样性要高于高效率组。Min 等[25]报道，在肉山羊的瘤胃中，*Methanobrevibacter* 的相对丰度会随饲粮浓缩单宁浓度的增加而线性降低。迄今为止，还未见性别对动物胃肠道古菌影响的相关报道。作者推测，性别本身可能对林麝肠道古菌的结构影响就较小，再加上本次试验中，雄性和雌性饲喂的都是同一饲粮，最终体现出组间没有显著差异。

4 结　论

在从门到属的各级分类水平上，雄性和雌性林麝粪便中古菌的结构和组成都没有显著差异，*Methanobrevibacter* 是林麝粪便中的优势古菌属。

参考文献：

[1] YANG Q S,MENG X X,XIA L,et al.Conservation status and causes of decline of musk deer (*Moschus* spp.) in China[J].Biological Conservation,2003,109(3):333–342.

[2] WRIGHT A D G,MA X L,OBISPO N E,et al.*Methanobrevibacter* phylotypes are the

dominant methanogens in sheep from Venezuela[J].Microbial Ecology,2008,56(2):390–394.

[3] CHAUDHARY P P,SIROHI S K,SAXENA J,et al.Diversity analysis of methanogens in rumen of *Bubalus bubalis* by 16S riboprinting and sequence analysis[J].Gene,2012,493(1):13–17.

[4] SINGH K M,TRIPATHI A K,PANDYA P R,et al.Methanogen diversity in the rumen of Indian Surti buffalo (*Bubalus bubalis*),assessed by 16S rDNA analysis[J].Research in Veterinary Science,2012,92(3):451–455.

[5] WRIGHT A D G,WILLIAMS A J,WINDER B,et al.Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in western Australia[J].Applied and Environmental Microbiology,2004,70(3):1263–1270.

[6] EVANS P N,HINDS L A,SLY L I,et al.Community composition and density of methanogens in the foregut of the Tammar wallaby (*Macropus eugenii*)[J].Applied and Environmental Microbiology,2009,75(8):2598–2602.

[7] SHIN E C,CHOI B R,LIM W J,et al.Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence[J].Anaerobe,2004,10(6):313–319.

[8] LUO Y H,WRIGHT A D G,LI Y L,et al.Diversity of methanogens in the hindgut of captive white rhinoceroses,*Ceratotherium simum*[J].BMC Microbiology,2013,13:207.

[9] RASTOGI G,RANADE D R,YEOLE T Y,et al.Molecular analyses of methanogen diversity associated with cattle dung[J].World Journal of Microbiology and Biotechnology,2008,24(12):2973–2979.

[10] PEI C X,MAO S Y,CHENG Y F,et al.Diversity,abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid,solid and epithelium fractions of Jinnan cattle[J].Animal,2010,4(1):20–29.

[11] TURNBULL K L,SMITH R P,ST-PIERRE B,et al.Molecular diversity of methanogens in fecal samples from Bactrian camels (*Camelusbactrianus*) at two zoos[J].Research in Veterinary Science,2012,93(1):246–249.

[12] HUANG X D,TAN H Y,LONG R J,et al.Comparison of methanogen diversity of yak (*Bos grunniens*) and cattle (*Bos taurus*) from the Qinghai-Tibetan Plateau,China[J].BMC Microbiology,2012,12:237.

[13] FRANK K L,ROGERS D R,OLINS H C,et al.Characterizing the distribution and rates of microbial sulfate reduction at Middle Valley hydrothermal vents[J].The ISME

Journal,2013,7(7):1391–1401.

[14] CAPORASO J G,KUCZYNSKI J,STOMBAUGH J,et al.QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J].Nature Methods,2010,7(5):335–336.

[15] HIGHLANDER S K.High throughput sequencing methods for microbiome profiling:application to food animal systems[J].Animal Health Research Reviews,2012,13(1):40–53.

[16] SOGIN M L,MORRISON H G,HUBER J A,et al.Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2006, 103(32):12115–12120.

[17] CAPORASO J G,LAUBER C L,WALTERS W A,et al.Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2011,108(Suppl.1):4516–4522.

[18] KIM M,MORRISON M,YU Z J,et al.Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes[J].FEMS Microbiology Ecology,2011,76(1):49–63.

[19] 王继文,王立志,闫天海,等.山羊瘤胃与粪便微生物多样性[J].动物营养学报,2015,27(8):2259–2571.

[20] WEAVER G A,KRAUSE J A,MILLER T L,et al.Incidence of methanogenic bacteria in a sigmoidoscopy population:an association of methanogenic bacteria and diverticulosis[J].Gut,1986,27(6):698–704.

[21] LEADBETTER J R,BREZNAK J A.Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp.nov.and *Methanobrevibacter curvatus* sp.nov.,isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*[J].Applied and Environmental Microbiology,1996,62(10):3620–3631.

[22] LEADBETTER J R,CROSBY L D,BREZNAK J A,et al.*Methanobrevibacter filiformis* sp.nov.,a filamentous methanogen from termite hindguts[J].Archives of Microbiology,1998,169(4):287–292.

[23] SUNDSET M A,EDWARDS J E,CHENG Y F,et al.Rumen microbial diversity in Svalbard reindeer,with particular emphasis on methanogenic archaea[J].FEMS Microbiology Ecology,2009,70(3):553–562.

[24] ZHOU M,HERNANDEZ-SANABRIA E,GUAN L L.Assessment of the microbial ecology

of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies[J]. Applied and Environmental Microbiology,2009,75(20):6524–6533.

[25] MIN B R,SOLAIMAN S,SHANGE R,et al.Gastrointestinal bacterial and methanogenic archaea diversity dynamics associated with condensed tannin-containing pine bark diet in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing[J].International Journal of Microbiology,2014,2014:141909.

Fecal Archaeal Diversity of Artificial Breeding Adult Forest Musk Deer Analyzed by High-Throughput Sequencing Technologies

WANG Lizhi[1] XU Yiying[1] CAI Yonghua[2]

（1. *Key Laboratory for Animal Disease-Resistance Nutrition of Ministry of Education*, *Animal Nutrition Institute of Sichuan Agricultural University*, *Ya'an* 625014, *China*;

2. Sichuan Institute of Musk Deer Breeding, *Dujiangyan* 611845, *China*）

Abstract: This experiment was conducted to invest the archaeal composition and abuandance in feces of artificial breeding adult forest musk deer (FMD) using high-throughput sequencing technologies, and to compare the difference between male and female FMD. Twelve healthy FMD with the age of three years were divided into male group (M) and female group (F) according to their gender (6 deer in each group). The fresh feces were collected and DNA was extracted from it. The archaeal universal primers were used to amplify V4 to V5 regions of archaeal 16S rRNA. The amplifications were high-throughput sequenced with the MiSeq 300PE sequencing platform. The QIIME and other softwares were used to analyze the data. The results showed as follows: from phylum to genus levels, the differences of the archaeal relative abundance between group M and group F were not significant (P>0.05). Genetic distance within the samples in group F and group M was （0.16±0.03） and （0.27±0.06）, respectively, and that between groups was（0.24±0.07）; all samples shared high similarity. The archaea in the feces of FMD can be divided into three phyla, the dominant phylum was Euryarchaeota; on the genus level they can be divided into seven existing genera, the dominant genus was *Methanobrevibacter*, the next one was *Thermogymnomonas*. In conclusion, the gender has no

---

Author, WANG Lizhi, associate professor, E-mail: wanglizhi@aliyun.com (责任编辑　王智航)

significant effect on the archaeal compositions and their abundance in the feces of FMD, and *Methanobrevibacter* is the dominant genus.

Key word: forest musk deer; archaea; methanogen; diversity